Introduction à la sémiologie biologique : de la prescription à l'interprétation d'un examen de biologie médicale (EBM)

Note : Le professeur précise que c'est un cours d'introduction légère et que les exemples ne sont pas à retenir mais leur logique doit être comprise. De plus ce ronéo sera relu par le professeur !

INFORMATION SUR LES EXAMENS : ~~Il y aura autant de questions pour tous les chapitres que nous aurons traité au moment des exams.~~ Il y a une question par heure de cours.

Rappels : La **biochimie** est une science qui étudie la structure des molécules vivantes, leur concentration dans chaque cellule ou dans chaque liquide biologique, leur mode de formation (biosynthèse, anabolisme) et leur transport et leur mode de destruction (dégradation ou catabolisme).
Il existe une google map du métabolisme (seules quelques voies ont été détaillées l'année dernière comme le cycle de Krebs). Connaitre le fonctionnement habituel du métabolisme permet de détecter la présence d'anomalies. La biologie s'applique à la clinique en mesurant des concentrations de substance dans divers liquides biologiques (sang, urines, LCE par ex) ou cellules (de manière ponctuelle ou dynamique). Il existe différents types de dosage comme celui de manière ponctuelle (statique) ou de manière dynamique par des explorations fonctionnelles qui lui permet de voir comment l'organisme répond à l'apport d'une molécule. (ex : le dépistage du diabète gestationnel (HGPO) qui se fait en ingérant du glucose par voie orale et en observant la réponse de l'organisme).
La sémiologie est la science qui étudie les signes et symptômes d'une pathologie. La **sémiologie biologique** est donc l'étude des signes biologiques qui participent à la mise en place d'un diagnostic, de prévention ou de dépistage, de suivi d'un traitement.

Objectifs de l'UE :

- Comprendre les bases moléculaires et cellulaires perturbées lors d'une pathologie
- Quels sont les marqueurs biologiques ? (Les marqueurs biologiques vont nous aider au diagnostic). Dans quel contexte ?
- Permettre une bonne prescription d'actes de biologie, savoir les interpréter en tenant compte du contexte, des limites et des pièges analytiques

Objectifs d'apprentissage de ce cours :

- Qu'est-ce qu'un examen de biologie médicale ?
- Les étapes de réalisation d'un examen de biologie médicale.
- Son interprétation.
- Ne pas tout attendre d'un dosage, il est important de se confronter au patient.

I) Qu'est-ce qu'un examen biologique ? (réponses binaires ou dosage quantitatif)

- **Visée diagnostique :**
  - Modification qualitative (pas précis mais permet de déceler la présence de cet molécule, réponse binaire= présence ou pas) ou quantitative de paramètres biologiques.

Ex : Troponine dans l'infarctus du myocarde, c'est le meilleur marqueur dans ce cas … ➔ au moment du diagnostic, on recherche les variations de sa concentration par rapport à la valeur seuil donc c'est un dosage quantitatif

  - Mise en évidence d'analytes normalement absents
  - Mise en évidence d'agents infectieux dans le sang (ou d'autres fluides comme les urines lors d'une infection urinaire ~~comme dans le cas d'un test COVID), par exemple lors d'une tentative de suicide au paracétamol on va doser le paracétamol~~
- **Surveillance thérapeutique :**

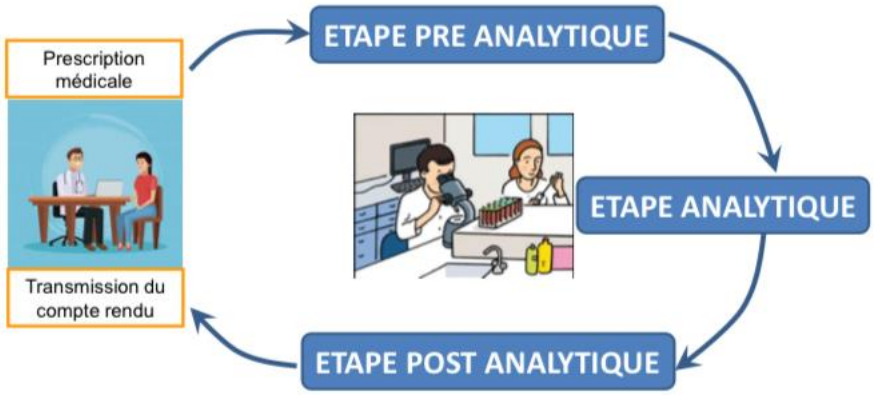
  - Déterminer l'efficacité d'un traitement, intoxication (ex : tentative de suicide), réadapter le dosage du traitement, ex : ATB, HbA1c, paracétamol, …
  - Déterminer la persistance d'un médicament dans le sang (observance du traitement)
- **Visée pronostique :** on essaye de prévoir ce qui va se passer chez le patient , hypothèse faite sur l'évolution d'une maladie

Ex : BNP (peptide natriurétique) dans l'insuffisance cardiaque ➔ dosé lors d'un infarctus du myocarde sur 24H pour savoir si le patient va bien s'en remettre, permet de voir si le remodelage ne se fait pas correctement ce qui occasionnerait un risque d'avoir de nouveau un problème (si le taux est élevé c'est mauvais signe, il risque d'y avoir d'autres évènements cardiaques).

- **Prévention / Dépistage ➔ DIAGNOSTIC ≠ DEPISTAGE (le dépistage ne permet pas de poser un diagnostic mais d'estimer la probabilité de la présence de la maladie) il faut un test de confirmation pour poser le diagnostique.**
  - Test de Guthrie à la naissance : 5 maladies avec une importante prévalence (mucoviscidose, hyperplasie congénitale surrénale, drépanocytose, hypothyroïdie, phénylcétonurie) (le nombre de maladies dépistées par le test de Guthrie est en train d'augmenter)
  - Trisomie 21 : dosage de marqueurs sériques de dépistage de T21 (ce n'est pas un diagnostique mais un calcul de risque donc non invasif !)

Dépistage : estimer la probabilité d'existence de la maladie et non de déterminer la présence ou l'absence d'une maladie.

Un examen de biologie médicale n'est pas seulement une analyse mais un ensemble de 3 étapes :



1) Plusieurs intervenants :

La biochimie et la physiologie, vu l'an dernier, ont permis d'acquérir des bases scientifiques. La **biologie clinique** est l'application de toutes ces données. C'est l'application de mesures propres à un individu, doser une molécule **à un moment donné**, et qui peuvent être **ponctuelles**, **répétées** ou lors d'un **test dynamique** (= stimuler la molécule).

Le **rapport Balloreau** stipule que tout examen biologique doit être sous la responsabilité d'un biologiste et signé par un biologiste (= médecin ou pharmacien).

L'examen de biologie médicale n'est pas seulement une analyse mais un ensemble de 3 étapes allant de l'étape pré-analytique (traitement de l'échantillon) à l'étape analytique (processus technique pour donner le résultat d'analyse biologique) puis l'étape post-analytique (validation biologique et interprétation). On part de la prescription médicale ensuite les trois étapes puis la transmission du compte rendu au patient. Les résultats peuvent être directement délivrés au patient par le laboratoire d'analyse mais dans certains cas le médecin prescripteur peut/doit les rendre *(ex : marqueurs ferriques pour le dépistage de la trisomie 21 pendant la grossesse, tests génétiques.)*

Lors d'un dosage, il y a plusieurs intervenants : le **patient**, le **prescripteur** (médecin, ou pour certaines situations par exemple en génétique les conseillers génétiques sont autorisés à prescrire sous la responsabilité d'un médecin) et le **laboratoire** avec comme personnels : des responsables (= personnel médical = médecins ou pharmaciens), des techniciens, des ingénieurs biomédicaux et des secrétaires. Il existe deux types de laboratoires en France : Les laboratoires **hospitaliers publics** et les laboratoires **privés** (70% des examens sont réalisés dont ces derniers). Actuellement, les laboratoires sont regroupés pour faire des centres plus importants. Ces 10 dernières années les laboratoires privés se sont de plus en plus regroupés par soucis financiers. Les lieux de prélèvements sont alors des centres dédiés uniquement aux prélèvements. Ces centres envoient les échantillons sur un plateau techniques où sont réalisées les analyses.

La notion d'urgence est importante en biologie mais contrairement à ce que l'on pense, **tous les dosages ne sont pas urgents**. Il y a une différence entre la **routine** (dosages de proximité, non spécialisés) et **l'urgence** (les résultats doivent être disponibles en 1 ou 2h). Certains examens sont faisables durant les gardes et d'autres non. Il existe ainsi différents niveaux d'urgence, dont l'urgence vitale, pour laquelle on obtient les résultats dans la demi-heure.

Ex : on aura le résultat d'un ionogramme en 2-3h alors qu'un dosage de troponine, dans le cas d'une suspicion d'infarctus du myocarde, sera prioritaire.

Un **examen spécialisé** désigne des dosages un peu plus longs à faire et dont les résultats ne sont pas immédiats. Il permet de réaliser des diagnostics et de trouver des traitements adaptés pour traiter des cancers, par exemple, des maladies plus rares

Les laboratoires de biologie médicale (LBM) étaient environ 5 000 en 2008 à moins de 400 aujourd'hui, beaucoup de labo ont été rachetés. Ils sont des centres de prélèvements équipés de plateaux techniques (700 plateaux techniques) (biologique ou bactériologique). La biologie médicale est une discipline polyvalente: biochimie, toxicologique, immunologique, hématologique, endocrinologique, bactériologique, virologique, parasitologique, diagnostic moléculaires, etc.

Il y a 4200 sites regroupés en LABM : 40% du marché est entre les mains de trois acteurs : Biogroup, Cerba et Inovie.

L'évolution des labos est due à la hausse des prescriptions par les médecins et donc la hausse des dépenses d'analyses d'autant plus avec le Covid (entre 2020 et 2022 : 120 000 000 de tests PCR), les campagnes de dépistage, le vieillissement de la population et l'augmentation de la réalisation des tests génétiques.

2) Des contraintes avec un poids économique

Tous les examens ne sont pas remboursés, il y a une différence entre le public et le privé.
Un laboratoire va être soumis à différents types de contraintes :

- **Financières** : les tarifs pratiqués par les laboratoires sont limités par les pouvoirs publics engagés dans une dynamique de maitrise des dépenses de santé =>bénéfices individuels et collectifs à évaluer, recommandations HAS, hiérarchie, consensus des sociétés savantes.
- **Réglementaires** (contraintes d'accréditation) : tout ce qui est fait doit être tracé pour pouvoir remonter à la source d'un problème s'il y en a un. Cela demande plus de travail et peut alors générer du retard dans la prise en charge de l'examen. Si le travail est mal fait, on parle de **non-conformité**, on ne fait alors pas l'examen. **L'accréditation** (exigences auxquelles le labo doit répondre) est en fait reliée à la traçabilité : le fait de rapporter qui a fait quoi.
- **/!\ L'examen biologique ne doit pas remplacer l'examen clinique.**

Bref historique : évolution vers l'assurance en qualité de soin (grosse évolution dans les années 70-80) :

- Années 70 : CQ
- 1994 GBEA : guide de bonnes exécutions des analyses de biologie médicale : respect des protocoles ~~et traçage de ce que l'on fait pour que tout soit bien fait.~~
- 1996 : certification des établissements de santé
- 2003 : accréditation volontaire NF en ISO 15189
- 2009 : Loi HPTS

- 2010 : accréditation obligatoire pour répondre aux normes réglementaires ~~(création d'emplois comme les ingénieurs qualité),~~ coûte beaucoup d'argent=> forçage du regroupement des labos

La norme NF EN ISO 15189 (ne pas retenir le numéro)
Organisme accréditeur: Le Cofrac

- **« Procédure selon laquelle un organisme faisant autorité fournit une reconnaissance formelle qu'une personne ou un organisme est compétent pour réaliser des tâches spécifiques »**. Il garantit la qualité et la sécurité, améliore l'organisation, préserve et transmet le savoir-faire et respecte la réglementation. Ainsi le but de l'accréditation est d'assurer la qualité et la compétence et de faire qu'il n'y ait plus de dérives.
- Il existe donc un cycle d'amélioration continue **PDCA : Plan (prévoir), Do (faire), Check (vérifier) et Act (Améliorer).**
- **Accréditation :** Une évaluation de la compétence de la structure et de la qualité des pratiques réalisées dans un labo de biologie médicale. Cette évaluation est réalisée par des pairs, des biologistes médicaux à l'aide de cette norme internationale ; elle concerne uniquement les entreprises.
- **La norme** : procédure idéale internationale définissant le management d'un mécanisme, de la prestation de services, de la fourniture de matériel ou de l'élaboration d'un produit. ISO : International Organization for Standardization
- **La certification** établit **la conformité** de produits, services (=/= accréditation)

II) Le prescripteur : le médecin

1) Prise en charge

La prise en charge d'un examen (différente entre l'hôpital et le privé), avant tout **financière**, est payée par l'hôpital puis remboursée directement par la Sécurité Sociale et de temps en temps par les protocoles thérapeutiques (prise en charge par le protocole, pas par le patient) ou de recherche (**PHRC** = Programme Hospitalier de Recherche Clinique).

Il y a une nomenclature qui donne le **prix d'un examen**. La facturation se fait avec la lettre **B (comme biologie** pour un médecin généraliste elle se fera avec la lettre G), qui correspond à **0,27€**. Pour chaque analyse, il existe un code de l'acte et une cotation en B (100 B = 27€).

Quand on prescrit un examen, il a un coût qui est remboursé par la Sécu, mais ils ne sont parfois pas remboursés. Il y a un code **NABM** (**N**omenclature des **A**ctes de **B**iologie **M**édicale) qui répertorie les actes biologiques remboursés par la Sécurité Sociale. Le répertoire est classé en différents chapitres regroupant des catégories telles que l'hormonologie, l'enzymologie ou les médicaments toxiques.

Il y a également le code **BHN** (**B**iologie **H**ors **N**omenclature), à la charge du patient, qui comprend les examens qui ne peuvent prétendre à aucun remboursement par la Sécurité Sociale (mais possibilité par les mutuelles). Il s'agit d'actes issus de découvertes récentes ou qui ne répondent pas au critère de remboursement par la Sécu (comme le séquençage de gènes par exemple). Donc si le patient a besoin de cet examen il devra le payer sauf s'il est à l'hôpital. Les laboratoires privés ne font que les B car ils ne sont pas remboursés pour les BHN.

Remarque : Bien comprendre que lorsqu'un patient est à l'hôpital, il ne paie rien. Le patient paie seulement les consultations ou les examens qu'il réalise en dehors de l'hôpital.

En remplacement des BHN, il existe les **RIHN** (**R**éférentiel des actes **I**nnovants **H**ors **N**omenclature) dont le but est de remplacer à long terme le remboursement des actes hors nomenclature après évaluation de leur utilité. Les RIHN sont pris en charges pendant 5 ans puis, selon leur utilité, ils peuvent passer en B, sinon ils ne sont plus remboursés.

À l'hôpital, il existe une notion de budget global (= T2A = tarification à l'activité), qui représente une limite d'actes par dossier (*par exemple, une appendicite sera facturée « X » euros et si cette appendicite se complique*

d'une péritonite, la facturation prend en compte les « X » euros de l'appendicite + « Y » euros de la péritonite. De même pour les consultations à l'hôpital). 1 jour à l'hôpital coûte environ 1000€.

Le dosage de la vitamine D est trop demandé. Or les normes définissant un déficit en vit D sont variables selon les organismes et les sociétés. Les cliniciens ont tendance à demander ce dosage systématiquement car l'ajout de l'hypovitaminose D sur le dossier clinique permet l'obtention de points en plus selon la T2A, donc l'hôpital touchera un peu plus d'argent. Il existe cependant une restriction depuis 2014, et si l'on prescrit en dehors de ces conditions, on ne sera pas remboursé. Maintenant, tout est réglementé. On dose la vitamine D en cas de suspicion de pathologies particulières (rachitisme, ostéomalacie, etc.)

2) Renseignements à fournir

Avant tout le médecin établit avec le patient un dialogue. Il discute de la prescription et explique au patient pourquoi celle-ci et les bénéfices attendus. Il pose le diagnostic, peut confirmer une suspicion (VPP), exclure une maladie (VPN), suivre un traitement. Il discute aussi du compte rendu de résultats avec son patient notamment lors de tests génétiques. Enfin il doit aussi obtenir le consentement obligatoire du patient pour certains tests (ceux de génétique dont les résultats doivent être rendus par le médecin, ex : dépistage trisomie 21 qui n'est pas systématique).

- Identification du patient : **nom, âge, poids, sexe, DDR = date des dernières règles, grossesse (taux de protéines plus bas), allaitement, ménopause, médicaments qui interfèrent sur les résultats.**

⇨ *Lorsque les renseignements cliniques ne sont pas sur la feuille, le biologiste peut alors mal interpréter, et il pourrait y avoir des erreurs. Avec les étiquettes on connaît le nom, l'âge et le sexe, **mais pas le poids**. On ne sait pas non plus si la patiente est enceinte, la date de ses dernières règles, s'il prend des médicaments, etc. Souvent, le nom de la maladie n'est pas non plus indiqué.*

- Analyses demandées : elles devraient être **prescrites** sur ordonnance du médecin *(d'où la nécessité de mettre le nom du prescripteur sur la fiche, afin que celui-ci puisse répondre aux questions du biologiste)*. Souvent, les bilans sont préparés d'avance, avant d'avoir vu le patient.

⚠ À la non-conformité des tubes envoyés vis-à-vis de l'**accréditation** !

- Renseignements diagnostiques ;
- Médicaments : important aussi car ils peuvent modifier le dosage ;
- **Consentement** +++ lors d'une étude génétique (ADN, diagnostic pré et postnatal avec le consentement de la femme enceinte), ou d'un protocole … Lorsqu'on trouve une maladie génétique il y a une obligation d'informer le reste de la famille, soit le patient le fait, soit le médecin peut le faire pour que la personne reste anonyme.

Remarque : Sur les fiches de renseignements, le prescripteur n'est souvent pas inscrit. De plus, l'infirmière peut préciser si le prélèvement a été difficile à réaliser ou si elle n'a pas pu avoir plus de liquide par exemple.
Il y a pleins d'examens qui doivent être faits dans des conditions particulières et demandant des prélèvements et des tubes particuliers. Par exemple, l'ammoniémie est délicate et doit être prélevée dans de la glace.
En néonatologie et en pédiatrie, on utilise des micro-tubes. Certains tubes, comme les tubes jaunes, ont du gel pour permettre de bien séparer sérum/GR + GB dans le tube.

3) Étapes avant la prescription

Avant la prescription, il faut avoir élaboré une hypothèse de diagnostic et cela grâce à **l'examen clinique**.

Il faut aussi réfléchir : **ne pas prescrire tout azimut et sans hiérarchie**. Il faut faire attention à la probabilité de trouver quelque chose de non pertinent si l'examen n'est pas adapté, et aux angoisses, coûts, investigations complémentaires inutiles. Enfin il faut éviter de rater la véritable cause du motif de consultation. Celui-ci se doit donc d'être de **bonne qualité** et doit comporter :

- Une **observation clinique :** contenant un interrogatoire où l'on demande par exemple les ATCD familiaux, de la maladie ainsi que le motif de la consultation (souvent l'interrogatoire se fait rétrospectivement) ;
- **Interprétation** de ces observations *(Il faut faire en ayant déjà en tête les possibles diagnostics) ;*

- **Établissement d'un diagnostic probable** (si possible avant de demander l'examen) ;
- Seulement après tout cela, **demande du type d'examen** (c'est là qu'intervient la **biologie**) pour confirmer ce diagnostic.

Il faut donc faire ces demandes d'examens selon :

- **Les possibilités du laboratoire** (si on est en cabinet, il faut prévoir le laboratoire à l'avance) ;
- **Le délai de réponse** → *Pour un examen spécialisé, il faut savoir où va aller le dosage car parfois, le laboratoire auquel on envoie le dosage le renverra à un laboratoire plus spécialisé.*
- Les **critères physiques du patient** (*par exemple il s'agira de minimiser les prises de sang faites aux nouveaunés, aux personnes âgées etc.*), des critères **psychologiques** (trop d'examens peuvent amenuiser leur importance auprès du patient) et **financiers** (patient assuré ou non, trop d'examens peuvent coûter chers alors qu'inutiles).

Dialogue patient/médecin :

- Discuter prescription pourquoi/bénéfice attendu ?
- Poser un diagnostic
- Confirmer une suspicion (VPP)
- Exclure une maladie (VPN)
- Suivre un traitement
- Consentement obligatoire du patient pour certains tests : dépistage T21, génétique
- Discuter résultats

III) Étapes pré-analytiques

L'étape pré-analytique est l'étape des traitements des prélèvements et des échantillons. Elle comprend l'accueil et la préparation du patient, le recueil des éléments cliniques, prélèvement des échantillons + identification, le transport, prétraitement, conservation pré analytique. C'est une étape cruciale car elle conditionne l'ensemble de la suite de l'examen médical (analytique et interprétation).

- Enjeux médico-économique : **68% des erreurs d'analyse de biologie médicale** : cela peut entrainer des retards ou des défauts de prises en charges et aussi des coûts directs ou indirects plus importants puisque ça peut occasionner de refaire des examens ou d'en faire d'autres parce qu'on pense que le patient est malade.
- Rôle de la communication et de la formation très important (avec les infirmières par exemple).

1) Prélèvements

Le prélèvement conditionne la qualité des résultats. Il faut s'assurer l'accueil et le confort optimal du patient (au repos, sans stress), suivre scrupuleusement les bonnes pratiques de prélèvement, *(exemple du dosage d'aldostérone : on obtient un résultat différent selon la position du patient, s'il est debout ou allongé*) s'assurer de la bonne identification de la personne pour les prélèvements (demander date de naissance) ~~et~~ respecter les règles d'asepsie et de sécurité et recueillir des éléments pertinents. Si le prélèvement ne se fait pas dans labo, il faut savoir comment ils vont être transportés dans le labo.

a. Les éléments pré-analytiques influençant l'interprétation

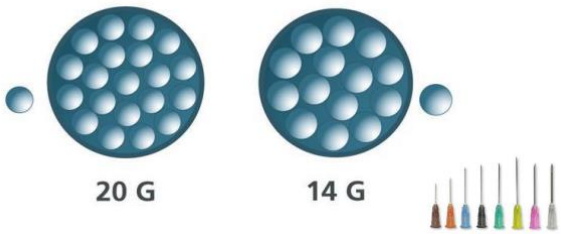
Les **facteurs liés au patient** se manifestant in vivo sont soient **non modifiables** (sexe, âge, origine ethnique, grossesse) ou **modifiables** (biorythme circadien *en général on effectue le dosage du cortisol lors du pic (8h*

du mat, à minuit il est au plus bas) mais si le patient à un travail de nuit, ce pic peut être décalé donc on ne va lui faire de prélèvement à 8h, le mode de vie, l'alimentation, le tabac, l'alcool, la préparation du patient pathologie et traitement, poids

- Faible volume de prélèvement pour les nourrissons.
- Il faut être à jeun strict pendant 12 h pour : glycémie, lipides (EAL = Exploration Anomalie Lipidique), on réalise un dosage des triglycérides/cholestérol/HDL.
- Il faut noter **l'heure**, la **position** *(ex : pour la rénine il faut être couché* / le dosage de la testostérone et de la cortisone (hormone du stress) sont différents en fonction du moment de la journée*).*

Les **facteurs non liés au patient** se manifestant in vitro :

- Préparation/identification : renseignements cliniques, étiquetage échantillon…
- Prélèvement : site de ponction, ordre et type de tubes…
- Conservation et transport : température de conservation et de transport, délai d'acheminement, abri de la lumière
- Préparation des échantillons : temps de coagulation, centrifugation…



b. Différents prélèvements

On a besoin d'un certificat pour pouvoir prélever. La nature du prélèvement biologique peut être sanguine (veineux, artériels*, capillaires), urinaire, liquide de ponction (LCR*, liquide pleural*, liquide articulaire*) ou urétral*, vaginal*, de phanères*. (* = prélèvement obligatoirement réalisé par un médecin ou une infirmière pour certains prélèvements à l'hôpital). À noter que le prélèvement veineux est le prélèvement sanguin de préférable. Pour le prélèvement par ponction veineuse sur les enfants de moins de 5 ans, il est réservé aux directeurs et directeurs adjoints de laboratoire. Les types de détermination demandés peuvent être biochimiques, hématologiques bactériologiques, parasitologiques et mycologiques.
Le prélèvement veineux est de moins en moins réalisé par la seringue, on utilise plutôt un trocart ou une aiguille épicrânienne (++ pour les prélèvements sensibles ou pédiatriques). Le prélèvement de sang type capillaire (au bout du doigt) est à l'origine de résultats non reproductibles donc réservé à des cas bien particuliers (ex : diabète). Les aiguilles doivent être jetées dans des poubelles spécialisées dans les déchets infectieux (DASRI = poubelles jaunes).

Petit point sur les aiguilles :
Le diamètre est exprimé en gauge (G) qui varie en fonction inverse du diamètre interne. En somme plus le nombre de Gauge est grand, plus le diamètre de l'aiguille est petit. En fait le nombre de Gauge correspond au nombre d'aiguilles que l'on peut mettre dans un gabarit en forme de cylindre de 1 pouce = 2,54 cm.
Il faut faire attention lors des prélèvements car les petites aiguilles favorisent la coagulation.

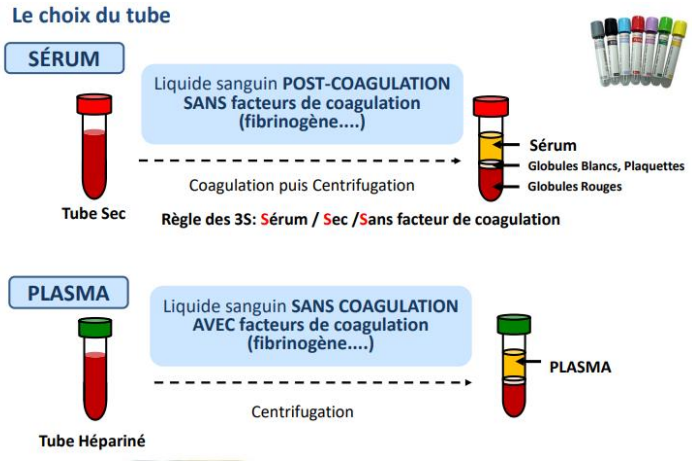
c. Le choix du tube (la prof aime bien cette partie)

Chaque tube a une couleur spécifique pour une utilisation spécifique.

- Prélèvements sanguins → Éviter l'hémolyse et l'hyperlipidémie !
- **Sérum** = liquide sanguin post-coagulation **sans** facteur de coagulation
    - Tubes secs : le caillot se forme (bouchon rouge)

- Tubes secs avec gel séparateur → le séparateur retient certains types de protéines et permet de décanter grâce à un gel
- Règle des 3 S : **Sérum Sec Sans facteur de coagulation** : Comme il n'y a pas de facteur de coagulation, le sang se coagule spontanément en transformant le fibrinogène en fibrine, c'est pourquoi le taux de protéines est plus faible que si on prélève sur un tube avec un anti-coagulant.

- **Plasma** = liquide sanguin sans coagulation **avec** facteurs de coagulation, ~~le surnageant après centrifugation~~ = avec anticoagulant / facteurs qui influence la coagulation (car pas de coagulation) pour éviter que la fibrine ne se forme
  - Tube avec anti-coagulant = tube bouchon vert/ hépariné



Lorsqu'on centrifuge on retrouve en haut le surnageant (=sérum) qui permet de doser les protéines et en bas les globules rouges.
NB : S'il y a un facteur de coagulation, on ne parle plus de tube sec

- Tubes **verts** : un ionogramme, bilan hépatique, lipidique
- Tubes **violets** : dose l'hémoglobine glyquée, hématologie, extraction de l'ADN (il faut se méfier du tube EDTA car il va venir chélater le calcium, sachant que le calcium permet de déclencher la coagulation)
- Tubes **oranges/rouges** sont des tubes secs avec séparateur avec gel, c'est-à-dire qu'après centrifugation on n'a pas besoin d'aller aspirer le surnageant pour le mettre dans un autre tube, on a juste à verser car le gel va permettre de maintenir les globules rouges en bas du tube et donc éviter de mélanger les différentes phases lorsque l'on retournera le tube. C'est le tube favori pour le transport des prélèvements dans différents sites.
- Tubes **gris** contiennent du **fluor** pour mesurer la **glycémie.** Le fluor permet de bloquer la glycolyse et donc d'avoir une glycémie qui reste stable (inhibition de la glycolyse en préservant l'oxygène pour que ça ne se transforme pas en lactate).
- Tubes **bleus/noirs** avec du citrate, utilisés pour l'hémostase (= empêche la coagulation de se faire)

Action des additifs : pas à savoir en détails

Additif	Action ANTICOAGULANTE
Héparinate de Lithium/Sodium	Potentialise l'antithrombine
EDTA di/tripotassique	Chélateur irréversible cation divalent (Ca2+)
Citrate trisodique	Chélateur réversible cation divalent (Ca2+)
Oxalate de potassium	Neutralisation Ca2+ par précipitation sous forme de sels (Oxalate de Calcium)

De plus l'ordre de prélèvement des tubes doit être respecté (le tube bleu toujours doit toujours être rempli jusqu'au trait et est le seul dans ce cas-là. Ca nous oblige donc à le remplir en premier au cas où la veine ne

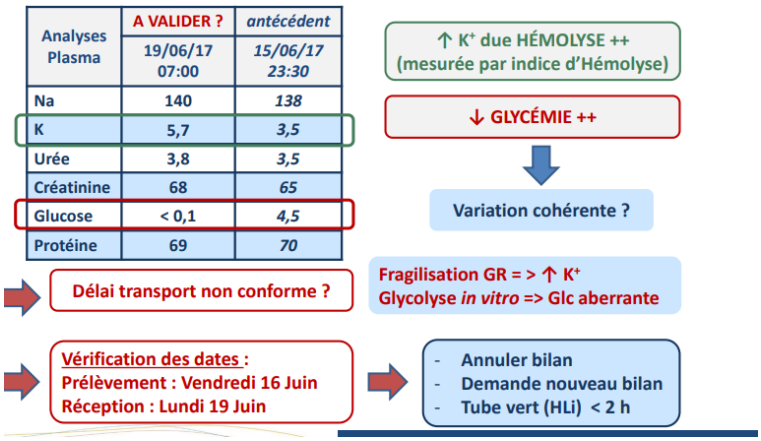
donnerait plus de sang). Cela permet d'éviter une contamination des additifs entre les tubes et d'avoir des résultats erronés. On ne prélève jamais avec un tube hépariné en premier (risque de perturber l'élan de coagulation)
Ordre des tubes : tube citraté (bleu) - tube gel SST (orange) - tube sec (rouge) - tube gel hépariné (vert) - tube EDTA (violet) - tube fluorure (gris).
Il ne faut jamais remplir le vert avant le bleu.

Il faut faire attention à l'**hémolyse** lorsqu'on prélève. Cela correspond à la lyse, à l'éclatement des globules rouges la libération du potassium, LDH, ASAT/ALAT… L'origine de l'hémolyse peut être due au patient, on parlera d'hémolyse in vivo ou hémolyse intravasculaire tandis que l'hémolyse in vitro ou artefact est liée au mauvais prélèvement (2-3% des cas). Cela entraine des interférences pré-analytiques, chimique lors du dosage ou encore sur des techniques de spectrophotométrie. Les causes de l'hémolyse in vitro sont multiples : éclatement de la veine lors du prélèvement qui entraine un éclatement facilité des globules rouges, la pose de garrot prolongé, l'utilisation d'une aiguille trop petite, une conservation et un transport prolongé de l'échantillon, peut aussi arriver au sein du labo si les conditions de centrifugation ne sont pas adaptées.
S'il y a trop d'hémolyse, on mesure un indice d'hémolyse -> quand le surnageant est trop rouge et que l'échantillon est trop hémolysé il est impossible de rendre un résultat. On demande alors un nouveau prélèvement.
Cela créer des interférences car le contenu cellulaire est libéré. Le globule rouge contient de l'hémoglobine qui possède plusieurs pics d'absorbance ou spectrophotométrie (415nm, 540nm et 570nm). En routine il y a beaucoup de technique qui utilise l'absorbance, si celle-ci est modifiée cela peut biaiser d'autre paramètres. Il existe aussi des interférences chimiques dans les dosages dû aux enzymes relarguées par l'hémolyse.
On mesure également l'ictérie (de plus en plus jaune) ou la lactécence
La prof donnera les valeurs des normes si elle met des bilans de contrôle.

d. Exemples d'erreurs pré-analytiques

- Erreur d'identification des tubes : variation incohérente des données. Il faut alors demander un nouveau prélèvement. Cela est très courant dans les labos.
- Erreur de tube : remplissage d'un tube dans un autre tube si arrêt d'écoulement du sang lors du prélèvement.
- Erreur de prélèvement : par exemple prélever du côté de la perfusion lorsqu'on recherche la glycémie peut erroner les résultats.
- Erreur de stockage ou de transport lorsque le tube traine plus de 24h dans le service ou quand le délai de transport est non conforme aux analyses (exemple : pour l'ammoniémie, le prélèvement ainsi que le transport se fait dans la glace, sinon cela libère des protéines et les résultats sont faux).

Les erreurs sont détaillées en exemples sur le diapo, il faut aller les voir pour comprendre comment les anomalies ont été décelée. Je vous en ai mis un dessous.



Bilan : Maitriser le pré-analytique (éviter les pièges, 70 % des erreurs de rendu de résultats)

1) Patient : grossesse, jeun, tabac, traitement
2) Identification : règle des 3B = bon patient, bonne étiquette, bon tube
3) Prélèvement : site de ponction, garrot, type, ordre, remplissage des tubes
4) Transport : délai, température et mode (pneumatique, pédestre)
5) Préparation : vitesse, température de centrifugation

IV) Étapes analytiques

1) Hospices civiles de Lyon

Il y a la présence de biologie sur le groupement hospitalier Nord (Croix-Rousse), Est (Louis Pradel, Pierre Wertheimer, FME) et Sud. A l'hôpital Edouard Herriot on ne réalise plus de biologie mais uniquement des gaz du sang.

a. Centres de Réception Tri Enregistrement

Les prélèvements sont réceptionnés et triés dans les hôpitaux dans des centres appelés **RTE (centres de Réception Tri Enregistrement**) (Groupement Est à Lyon).

Les prélèvements arrivent pour la plupart par un système pneumatique. Les tubes prélevés dans les services sont mis dans un premier sac avec le bon de description et l'ensemble est mis dans un sac parachute qui permet de transporter le sac du service jusqu'au labo. Ainsi des pneumatiques partent du service cardio, neuro, de l'hôpital mère-enfant et communiquent avec le centre de tri. Il existe même des pneumatiques entre l'HEH et le centre de biologie Est.

La biochimie à l'Est est l'un des plus grands plateaux d'Europe, on dénombre 6 320 000 actes/an (tests biochimiques et dosages immunologiques), 48 millions B/BHN/a, 2000 à 3000 tubes/j (plutôt 3500 aujourd'hui), 300 -350 GDS/j, 15-20 LCR/j, dont 30% sont urgents. Sur le plateau il y a une centaine d'examens biochimique différents. On coûte 40 millions de B par an.

Ainsi les tubes arrivés par les **pneumatiques** sont enregistrés et vont avoir des codes-barres qui permettent de déterminer quelle analyse est à faire et donc de l'orienter sur la chaîne grâce aux différents lecteurs de code barre. Les tubes sont dans un premier temps disposés sur un tapis roulant, ils sont ensuite centrifugés puis soumis à différents lecteurs qui vérifient où en est le tube, ce qu'il fait et ce qu'il doit faire. Pour réaliser les analyses, on dispose des analyseurs (ionogramme, dosage, protéine…) et des automates (immunodosage comme la TSH).

Les chaines permettent d'avoir une **cadence** pour réaliser des actes rapidement : pas plus de 2min d'attente au niveau de l'entrée, lancement automatique au bout de 12min, centrifuge pendant 10min et ensuite les analyseurs (temps variable selon le type de dosage). L'analyse peut durer jusqu'à 20min. Ainsi, un bilan urgent est dosé en 40 minutes (troponine) et un non-urgent en 60min (ionogramme). Un gaz du sang nécessitant une analyse rapide est rendu en 15min. Certaines analyses en revanche prennent plus de temps car une réaction enzymatique est impliquée, elle nécessite un temps d'incubation propre (immunodosage pour cortisone -> + de 30min).

Après les analyses, le tube se range tout seul grâce aux rayonnements et grâce aux codes-barres, on sait où se trouve notre tube.
Différents types de tubes : pédiatriques (prélève des plus petits volumes). Tous les tubes après dosage sont scellés pour éviter des échanges gazeux trop importants.

Étape **technique** proprement dite qui se constitue de :

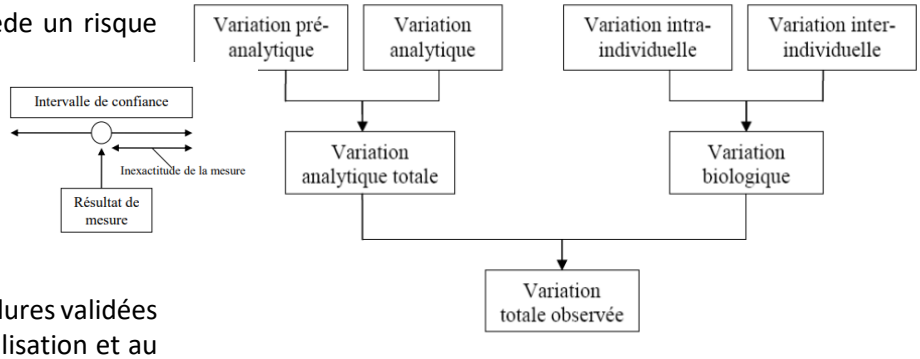
- Réactions chimiques : réactif spécifique du composé à mesurer (ex : bilirubine);
- Réactions enzymatiques : utilisation spécificité de l'enzyme vis-à-vis du substrat
  équation de Michaelis-Menten *(ex : dosage du glucose en dosant indirectement la glucose oxydase afin de mesurer le réactif/glucose, on dose le NADH, H+*)

- Réactions électrométriques : surtout mesures des ions *(comme pour un ionogramme)*
- Réactions immunologiques : exploitation de la spécificité de liaison d'un AC avec un AG
  anticorps qui reconnaissent antigène TSH => Technique ELISA, molécules à faible concentration (nmol à pmol/L => pour *l'oestradiol par exemple*)
- Techniques séparatives : chromatographie, spectrométrie de masse, Western Blot

Exemple d'automate de biochimie

Dans un premier temps, une aiguille va prélever le sérum, le mettre dans une cassette de réactif. L'échantillon est alors dans une sorte de carrousel avec différents réactifs, des endroits pour l'incubation, la lecture…
Il existe des zones thermostatées à 37°, une zone pour nettoyer les aiguilles et ainsi éviter toute contamination…
Maintenant, ce sont des robots automatisés qui centrifugent les tubes, et enlèvent aussi les bouchons. Les prélèvements peuvent être stockés après centrifugation dans des chambres froides.

La Biologie n'est pas une science exacte, tout résultat fruit d'une mesure expérimentale possède un risque d'erreur. Dans cette accréditation il est nécessaire au laboratoire de répondre à quel point on se trompe. Il faut être capable de prouver que l'incertitude est exacte et précise. Il faut donc connaître les limites de nos techniques.
Enfin il est important d'utiliser des procédures validées et de vérifier les méthodes avant son utilisation et au cours du temps. Le guide des techniques d'utilisation du COFRAC sert de référence.



Les techniciens sont amenés à faire plusieurs maintenance des automates dans la journée pour garantir un résultat fiable.
L'objectif à la fin est de donner un intervalle de confiance autour du résultat trouvé afin de donner des résultats corrects et de voir la limite de nos performances.
Elément impactant le résultat :

1) Variations dues au dosage

a. Erreurs aléatoires = précision du dosage

Il faut que le biologiste évalue si son résultat est correct : c'est la reproductibilité.

- Similitude entre des mesures répétées sur un même échantillon dosé plusieurs fois (on voit si on trouve toujours le même résultat).

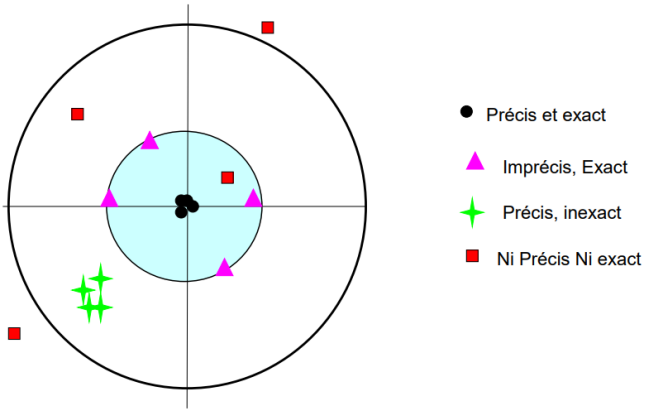
Ex : Dans un dosage avec des valeurs basses comme pour la rénine, il y a les grandes variations de reproductibilité intra-essai, de même qu'avec le cholestérol, alors qu'il y a peu de variations avec le sodium.

- Erreur venant de la « technicienne », du matériel… (volume, instabilité…).
- Répétabilité (30 fois au même moment) et reproductibilité (fidélité intermédiaire, dosage à différents moments)

b. Erreurs systématiques = exactitude, justesse

- Concentration de l'échantillon

Pour certaine analyse il existe différent kit de dosage selon les laboratoires (ce qui entraine une légère différence de concentration entre un labo A et un labo B). Les labos possèdent leurs propres valeurs de références. Pour savoir lequel des tests est juste les labos se comparent à une technique de référence qui ne peut être utilisée de partout dû à son coût.
En règle générale, les examens biologiques sont toujours à faire dans le même labo pour rendre les résultats comparables



- L'erreur aléatoire correspond à l'espacement des points → précision
- L'erreur systématique correspond au décalage par rapport au centre → exactitude
- Le rond extérieur fait office de limite acceptable. Le rond central marque l'exactitude.

*Remarque : Tous les matins les dosages sont vérifiés pour assurer la justesse et la précision par : un **contrôle interne de qualité (CIQ)** des performances des automates*

- *NB : Il existe aussi une Evaluation externe de la qualité (EEQ) inter-laboratoire afin de s'homogénéiser entre les différents labos, ce qui nous permettra de calculer l'incertitude de mesure (erreur totale analytique).*

Si le résultat se positionne à plus de 2 déviations standards il est impossible de le rendre. Il faut vérifier l'automate et se remettre en question -> il est possible que pour les patients justes avant l'automate était déjà déréglé.

Ex : Le dosage de l'aldostérone est très difficile car le résultat est en pmol/L et la plupart des kits du commerce donnent des résultats très dispersés. Par exemple dans ce cas, le sérum de contrôle a une valeur pouvant passer de 35 à 275 pmol/L selon le dosage utilisé. Maintenant, si on a des taux bas ou habituels, on ne dose plus.

c. La spécificité, sélectivité

Il faut savoir si un dosage est spécifique, si l'anticorps reconnait la molécule recherchée ou une autre et donc de *savoir si notre AC sait reconnaitre petites/grandes molécules...*

d. La sensibilité, limite de détection, de quantification, de linéarité

Voir jusqu'où on peut descendre dans les dosages et rendre un résultat interprétable et reproductible.
Important de connaitre le domaine de linéarité afin d'éviter la saturation et donc que les résultats soient les mêmes entre les patients (plateau de saturation).

e. Caractéristique d'un dosage

La sensibilité analytique = capacité de détection de l'appareil (*Ex : pour la rénine, l'appareil détecte 0,4 ng/L).* Deux paramètres sont importants à prendre en compte pour caractériser un dosage, **LoD** et **LoQ** (+++).
NB : L'appareil juxtaglomérulaire secrète la rénine dans le sang (augmente quand manque de sel ou lors d'hypotension par ex).

⇨ **LoD = Limite de Détection**

On fait un dosage avec 30 mesures d'un tube blanc (tube sans rénine), on calcule la moyenne de la mesure et les écart-types. La valeur de LoD est celle correspondant à trois écarts types de la moyenne des blancs (noté + 3DS du zéro).

Ex : La valeur limite de détection de la rénine est de 1,1 ng/L (on obtient donc un dosage de 1,1 ng/L alors qu'il n'y a pas de rénine dans le tube !) : si c'est inférieur à 1,1, soit il n'y a pas de rénine dans le tube soit en infime quantité.

⇨ **LoQ= Limite de Quantification**

Elle correspond à la plus basse valeur rendue aux cliniciens. C'est la valeur pour laquelle le coefficient de variation (CV) est inférieur à **20%**. Elle est obtenue en mesurant plusieurs fois, dans la même série ou dans des séries différentes, des échantillons avec des valeurs un peu supérieures au LoD et on calcule le coefficient de variation.

Ex : Le LoQ de la rénine est de 3ng/L. Donc tous résultats inférieurs à 3 ng/L (par exemple 2,9 ou 1,3 ng/L) sont rendus <3 ng/L. Le laboratoire ne peut donc pas donner plus précisément la valeur du dosage.

V) Étapes post analytiques : analyse/ interprétation des résultats

1) Le biologiste

- **Validation des résultats bruts :**
  Le biologiste va regarder les contrôles et voir s'il peut le valider en tant qu'étude analytique.
- **Cohérence de l'ensemble du bilan, des résultats :** variabilité biologique intra-individuelle/inter-individuel (valeurs de référence), seuils de décision (limite entre population de référence et population de malade : notion de marqueur), variabilité biologique, réponse binaire ou quantitative, interférences
- **Feuille de résultats : ⚠️ déviation standard (DS) = écart type.**
  En plus, le biologiste donne une feuille de résultats sur laquelle il doit mettre des normes qu'il donne soit en déviation standard, soit en valeurs extrêmes. Il est obligatoire de marquer sur les résultats l'automate et la méthode utilisés car les résultats peuvent varier.
  NB : On voudrait une courbe gaussienne des résultats mais le plus souvent on ne l'a pas.

⇨ **NOTION DE DEVIATION STANDARD (DS) OU ECART TYPE : VALEUR STATISTIQUE**

✓ 1 DS est une valeur statistique qui correspond à +/- 66 à 68 % de la population.
✓ **2 DS** correspond à environ 95% = **Intervalle de référence**
✓ 3 DS correspondent à 99%.
➔ Les résultats donnés sur la feuille de résultats sont souvent à +/- 2 DS. Un résultat supérieur à 1 DS ne signifie donc pas forcément une maladie.

DS ou écart type = valeur statistique
Valeur extrême ≠ valeur statistique

⇨ **VALEURS DES EXTREMES = valeurs min et max dans population prise comme témoin**

De plus en plus, on ne met pas les DS mais des **valeurs extrêmes** ; ce n'est pas une valeur statistique. On donne les valeurs extrêmes correspondantes à celles de la population prise comme témoin. Souvent, il est difficile d'interpréter les résultats :

- Variable selon la question médicale posée ➔ ex : Troponine et IDM (dosage très performant qui nous permet de doser des très petites doses de troponine) → Avoir donc une limite de décision

- Variable selon les méthodes (immunodosage) chaque technique doit avoir des valeurs de références dans chaque laboratoire, dites valeurs normales.
- Variable selon le sexe, âge…
- Attention aux unités qui peuvent variés selon les laboratoires (SI préférées)

2) Informativité d'un test

C'est la capacité d'un test à :

- Identifier la présence de la maladie ;
- A distinguer le sujet malade et le sujet sain.

Valeurs diagnostiques ou pronostiques - caractéristiques intrinsèques (Se, Sp) et extrinsèques (VPP,VPN) servent à établir des seuils
Calculs non demandés à l'examen

NB : la sensibilité de la méthode est différente de la sensibilité de l'examen !

On définit :

Vrais positifs VP	Vrais Négatifs VN
Faux positifs FP	Faux Négatifs FN

Ainsi, on a :

Sensibilité : capacité à isoler les sujets malades $\frac{VP}{VP+FN}$	**Spécificité** : capacité à isoler les sujets sains $\frac{VN}{VN+FP}$

On détermine la **sensibilité de la valeur diagnostique** (≠ sensibilité vue pour l'étape analytique du dosage) qui est la capacité à isoler les sujets malades.

Valeur Prédictive Positive : Le probabilité d'être malade si le test est positif (défini par la valeur seuil qu'on a choisie). **VP / VP + FP**	**Valeur Prédictive Négative** : Le probabilité d'être non malade si le test est négatif (défini par la valeur seuil qu'on a choisie). **VN / VN + FN**

Ex: performance marqueurs sériques de la T21

T1	Malade	Sain	Total tests	Valeurs prédictives
Test positif	82	1631	1713	VPP 4,8%
Test négatif	6	47800	47806	VPN 99,98%
Total tests	88	49431	49519	
	Se 93,2%	Sp 96,7%		

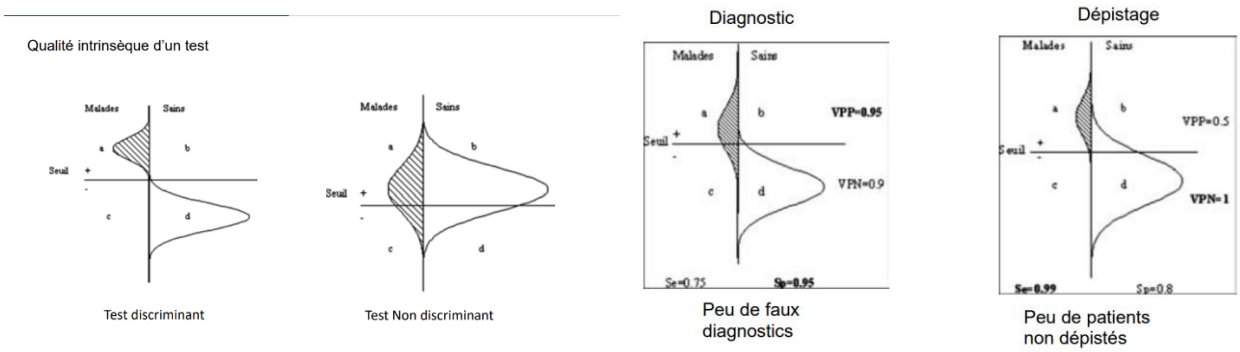
T2	Malade	Sain	Total tests	Valeur s prédictives
Test positif	12	874	886	VPP 1,35%
Test négatif	12	10361	10373	VPN 99,9%
Total tests	24	11235	11259	
	Se 50%	Sp 92,2%		

T1 et T2	Malade	Sain	Total tests	Valeurs prédictives
Test positif	94	2423	2517	VPP 3,73%
Test négatif	18	58143	58161	VPN 99,9%
Total tests	112	60566	60678	
	Se 83,9%	Sp 95,9%		

VPP et VPN Région Rhône Alpes Auvergne 2016

On privilégie ce test lors du T1 car on observe une meilleure sensibilité et donc une plus grande chance de détecter les marqueurs d'une suspicion de T21. Pour confirmer cela on réalisera un geste plus invasif (ponction liquide amnio). Il est donc important de voir les caractéristiques d'un test pour voir si on est dans du dépistage ou du diagnostic.

On rate peu de vrais malades (vrais positifs), les seuils sont bas mais il y en a beaucoup de faux positifs.



⇨ ***Si on veut du diagnostic, on veut peu de faux diagnostics (faux positifs en b) tandis que si on cherche un dépistage, on veut peu de patients non dépistés (maximum de positifs en a et b).***

4) Validation biologique

- Par le biologiste
- Réalisée a posteriori si elle est impossible en temps réel
- Si utilisation des résultats par le clinicien avant la validation, celui-ci engage sa propre responsabilité (contrat entre le biologiste et le clinicien).

Remarque : les valeurs de référence d'un prélèvement peuvent varier d'un laboratoire à l'autre en raison de variations techniques

VI) Biologie décentralisée/délocalisée

Norme NF EN ISO 22870 (biologie délocalisée)
- **« analyses réalisées à proximité du patient ou à l'endroit où il se trouve, dont le résultat peut entraîner une éventuelle modification des soins prodigués au patient », en dehors des locaux du labo de biologie médicale, au seain d'établissements de soins publics ou privés et par du personnel extérieur au labo**
- Ex : GDS, Hémoglobine A1c, Marqueurs cardiaques, CRP, Lactates, Coagulation, Calcium ionisé …

→ **Responsabilité du Biologiste**

Exemple Gaz du Sang : Le prélèvement est réalisé par un médecin car ces mesures se font sur du sang artériel en majeure partie. Prélèvement en général sur héparine et à l'abri de l'air et transmis immédiatement au laboratoire et analysé en moins de 15 minutes

Qui est autorisé à réaliser des EBMD (examen de biologie médicale délocalisée) ?
Arrêté du 13 août 2014 : autres que les biologistes médicaux en vue d'une décision thérapeutique urgente
- Les médecins
- Les sages-femmes
- Les infirmiers
- Les techniciens de laboratoire

Arrêté du 1 août 2016 : ce qui n'est pas le la biologie médicale

Tests	Utilisateurs
Bandelettes urinaires	IDE, SF, M
Test capillaire d'évaluation de la glycémie	IDE, SF, M, P
Test vaginal de rupture prématurée des membranes foetales	SF, M, PSRM
Test transcutané d'évaluation de la bilirubinémie	SF, M, PSRM
Mesure transcutanée des paramètres d'oxygénation	SF, M, PSRM
Test rapide d'orientation diagnostiques (TROD) VIH et hépatite C	SF, M, PSRM
Test oro-pharyngé d'orientation diagnostique des angines à streptocoque du groupe A	M, PSRM, P
Test naso-pharyngé d'orientation diagnostique de la grippe	M, PSRM, P
Test capillaire de détection de l'état immunitaire vis à vis du tétanos	M, PSRM
Test d'évaluation de la glycémie et de la cétonémie	M, PSRM

Le professeur stipule que tous les tests présents dans le tableau ne sont pas des tests de biologie médicale et ne sont donc pas sous la responsabilité du biologiste

L'article L. 6211-3 du Code de la Santé Publique [G] précise :

- **« ne constituent pas un examen de biologie médicale un test, un recueil et un traitement de signaux biologiques, à visée de dépistage, d'orientation diagnostique ou d'adaptation thérapeutique immédiate. »**
- - **…sans substituer au diagnostic réalisé au moyen d'un examen de biologie médicale.»**

Le résultat est rendu sous la responsabilité du professionnel de santé réalisant les tests.

2 types de tests n'entrant pas dans la biologie médicale:

- Usage médical:

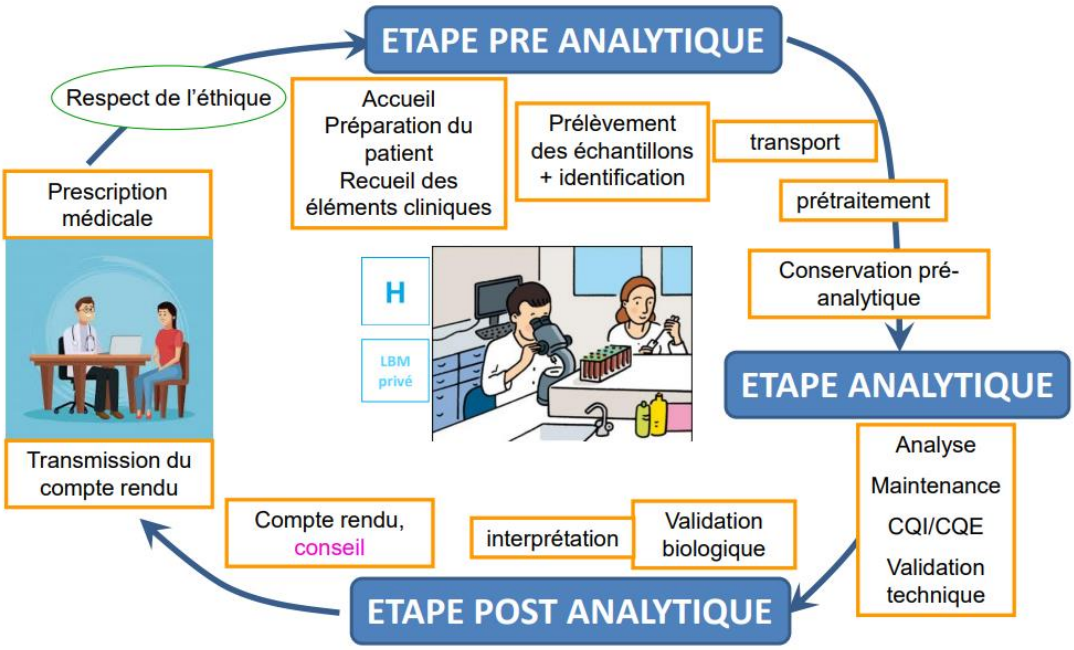
- Tests réalisés par du personnel médical ou paramédical; Bedsidetesting, point of care testing (POCT=EBMD),
- Doctor's tests TROD (Test rapide d'orientation diagnostique)

- Utilisation principalement par le grand public:

Autotests, Home tests ; ex: glycémie, tests de grossesse

TAKE HOME MESSAGES

- **L'examen comprend trois étapes**
- Prescrire un test **ne fait pas un diagnostic** !
- Savoir quelles sont les indications et les performances
- Suivre les recommandations officielles
- Hiérarchiser sa prescription
- **Discussion clinico biologique +++**
- Expliquer et commenter les résultats aux patients
- Se tenir au courant des évolutions
- Le biologiste doit bien connaitre les techniques
- Beaucoup de contraintes réglementaires, économiques +++


ETAPE PRE ANALYTIQUE
Respect de l'éthique
Accueil
Préparation du patient
Recueil des éléments cliniques
Prélèvement des échantillons + identification
transport
prétraitement
Conservation pré-analytique
Prescription médicale
H
LBM privé
ETAPE ANALYTIQUE
Analyse
Maintenance
CQI/CQE
Validation technique
Transmission du compte rendu
Compte rendu, conseil
interprétation
Validation biologique
ETAPE POST ANALYTIQUE